

Dominik Hans Willi Leitz  
Dr. med.

## **Conditional deletion of Nedd4-2 in lung epithelial cells causes progressive interstitial lung disease in neonatal and adult mice**

Fach/Einrichtung: Kinderheilkunde  
Doktorvater: Prof. Dr. med. Marcus Mall

Interstitial lung diseases (ILD) constitute a heterogeneous group of pulmonary diseases in pediatric and adult patients characterized by inflammation, fibrotic remodeling, and impaired gas exchange in the lung. Several mutations in genes important for epithelial cell function have been reported to be associated with ILD. However, the role of epithelial dysfunction in their pathogenesis need further investigations. The E3 ubiquitin-protein ligase NEDD4-2 was shown to participate in the regulation of the epithelial sodium channel (ENaC), surfactant protein-C biosynthesis and TGF $\beta$  signaling, all of which are involved in epithelial homeostasis and, when dysregulated, implicated in the development of chronic lung disease and fibrosis.

This work characterized neonatal and adult mice with conditional deletion of Nedd4-2 in lung epithelial cells. Neonatal conditional Nedd4-2 deficient mice developed spontaneous parenchymal lung disease, manifesting through massive sterile pneumonitis and hyperplasia of alveolar type 2 cells. This resulted in impaired blood oxygenation and premature death of those mice three to four weeks after birth. The described changes reflect clinical and histological features seen in pediatric ILD (chILD) with mutations affecting epithelial cell function. In adult mice, conditional deletion of Nedd4-2 lead to spontaneous chronic progressive ILD with reduced pulmonary compliance, usual interstitial pneumonia pattern in micro CT imaging, and patchy fibrosis in the periphery of the lung with honeycomb-like cysts and fibroblast foci-like structures. Those are key features that are commonly seen in idiopathic pulmonary fibrosis patients. Electrophysiological experiments showed increased activity of ENaC, which was associated with airway surface liquid depletion and subsequent impairment of mucociliary transport, in conditional Nedd4 2 deficient mice. These changes were already apparent before first clinical signs of disease. Increasing levels of TGF $\beta$  over time and subsequent deposition of extracellular matrix proteins indicate a possible role of the TGF $\beta$  signaling pathway in perpetuating fibrotic lung disease.

In summary, this work established a novel mouse model for idiopathic chILD and IPF. The data suggest that impaired mucociliary clearance in coincidence with increased responsiveness to TGF $\beta$  plays an important role in the development of ILD. This model may be useful to study the pathogenesis of idiopathic chILD and IPF and to discover biological pathways and biomarkers in early pathogenesis of these diseases. Furthermore, it may help to develop and test novel therapeutic strategies for chILD and adult patients suffering from IPF.

### Zusammenfassung

Interstitielle Lungenerkrankungen (ILD) umfassen eine Gruppe von Lungenerkrankungen, die sowohl bei Kindern als auch Erwachsenen auftreten und durch Entzündung sowie einen fibrotischen Umbau des Lungenwebewes mit Beeinträchtigung des Gasaustausches gekennzeichnet sind. Mehrere Mutationen in für die Funktion von Epithelzellen wichtigen Genen wurden bereits mit ILD in Verbindung gebracht. Die Rolle der epithelialen Dysfunktion in der Pathogenese erfordert noch weitere Untersuchungen. Es wurde gezeigt, dass die E3-Ubiquitin-Ligase NEDD4-2 an der Regulation des epithelialen Natriumkanals (ENaC), der Surfactant-Protein-C-Biosynthese und der TGF $\beta$ -Signalübertragung beteiligt ist, welche alle bei der epithelialen Homöostase eine Rolle spielen und bei Dysregulation an der Entstehung von chronischen Lungenerkrankungen und Fibrose beteiligt sind.

Diese Arbeit charakterisiert neugeborene und erwachsene Mäuse mit einer konditionalen Deletion von Nedd4-2 in Lungenepithelzellen. Neugeborene konditionale Nedd4-2 defiziente Mäuse entwickelten eine parenchymale Lungenerkrankung, die durch massive Pneumonitis und Hyperplasie von Typ-2-Pneumozyten gekennzeichnet war. Dies führte zur Beeinträchtigung der Blutoxygenierung und dem vorzeitigen Tod der Mäuse drei bis vier Wochen nach Geburt. Die beschriebenen Veränderungen reflektieren klinische und histologische Merkmale, die bei Kindern mit ILD (chILD) beobachtet werden, verursacht durch für die Epithelzellfunktion wichtige Genmutationen. Bei erwachsenen Mäusen führte die konditionale Deletion von Nedd4 2 zu einer chronisch progredienten ILD mit verringerter Lungencompliance, einem „usual interstitial pneumonia pattern“ in der Mikro-CT-Bildgebung und einer inhomogen verteilten Fibrose in der Peripherie der Lunge mit honigwabenartigen Zysten und Fibroblastenherden, welche typischerweise bei Patienten mit idiopathischer pulmonaler Fibrose (IPF) zu sehen sind. Elektrophysiologische Experimente zeigten eine erhöhte Aktivität von ENaC, die mit einer dehydrierten Atemwegsoberfläche und einer damit einhergehenden Beeinträchtigung des mukoziliären Transports in konditionalen Nedd4-2 defizienten Mäusen verbunden war. Diese Veränderungen waren bereits vor dem Auftreten der ersten klinischen Krankheitszeichen zu beobachten. Steigende TGF $\beta$ -Spiegel im Krankheitsverlauf und die resultierende Produktion von Proteinen der extrazellulären Matrix weisen auf eine wichtige Rolle des TGF $\beta$ -Signalwegs bei der Verstärkung der fibrotischen Lungenerkrankung hin.

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit ein neues Mausmodell für chILD und IPF etabliert. Die Daten legen nahe, dass eine beeinträchtigte mukoziliäre Clearance in Verbindung mit einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber TGF $\beta$  eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von ILD spielt. Dieses Modell könnte bei der Erforschung der Pathogenese von chILD sowie IPF helfen und ist geeignet, Biomarker in frühen Stadien dieser Krankheiten zu untersuchen. Darüber hinaus kann dieses Modell dabei helfen, neuartige Therapiestrategien für chILD und IPF zu entwickeln und zu testen.